

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年11月8日 (08.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/82927 A1(51) 国際特許分類⁷: A61K 31/22, 31/23, 31/231, 45/00,
31/122, 31/216, A61P 31/18 // C07C 69/22, 69/533, 69/58[JP/JP]; 〒930-0912 富山県富山市日俣77番3 Toyama
(JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/02913

(22) 国際出願日: 2000年5月2日 (02.05.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): リー
ドケミカル株式会社 (LEAD CHEMICAL CO., LTD.)

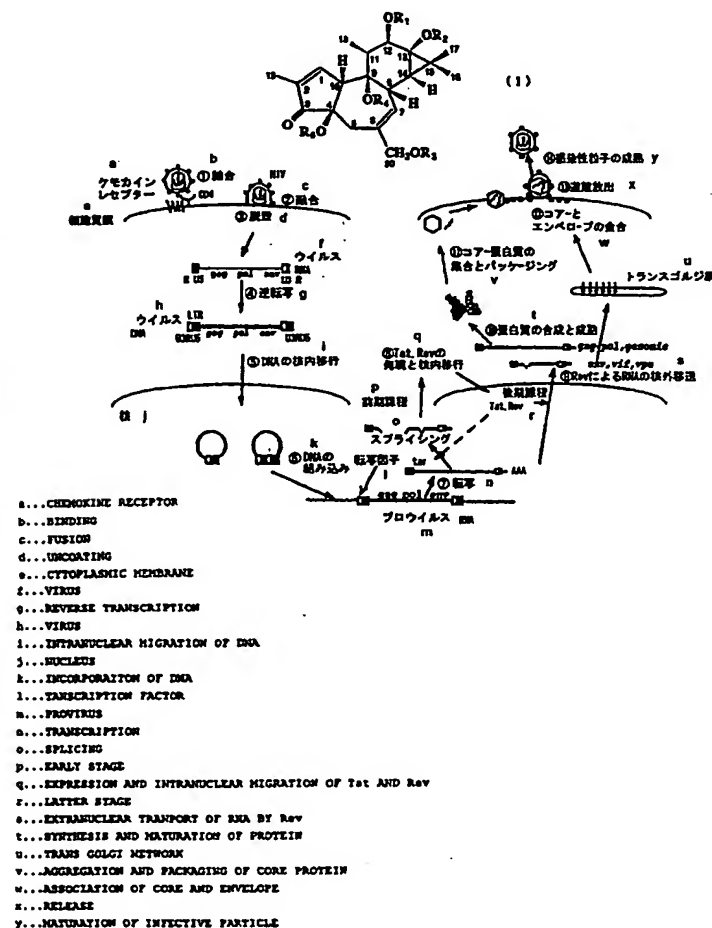
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 服部征雄 (HAT-
TORI, Masao) [JP/JP]; 〒930-0884 富山県富山市五福
末広町2556-4 Toyama (JP). 山本直樹 (YAMAMOTO,
Naoki) [JP/JP]; 〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45
Tokyo (JP). 森 政雄 (MORI, Masao) [JP/JP]; 〒930-
0955 富山県富山市天正寺248番地 Toyama (JP).

[続葉有]

(54) Title: ANTIBIRAL COMPOSITIONS CONTAINING PHORBOL DERIVATIVES AS THE MAIN ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: ホルボル誘導体を主な有効成分とする抗ウイルス配合剤



(57) Abstract: Antiviral compositions containing as the active ingredients: (i) phorbol derivatives which are represented by the general formula (I), have a ratio $r=CC_0/IC_{100}$ of 2 or more (wherein IC_{100} represents the concentration at which the cell pathogenic effect (CPE) of HIV-1 in MT-4 cells is inhibited at a ratio of 100%; and CC_0 represents the concentration at which the survival of MT-4 cells is reduced in a cell proliferation test), and show activation of protein kinase C (PKC) at a concentration of 10 ng/mL of 30% or less; and (ii) a chemical capable of suppressing or inhibiting the replication process or the maturation process of viruses. In said formula (I), wherein R_1 , R_2 , R_3 , R_4 and R_5 independently represent each hydrogen, an aliphatic carboxylate or an aromatic carboxylate. These compositions are efficacious particularly against human immunodeficiency virus (HIV).

[続葉有]



WO 01/00000 A1



(74) 代理人: 萁 経夫, 外(HANABUSA, Tsuneo et al.); 〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台1丁目6番地 お茶の水スクエアB館 萁特許事務所内 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

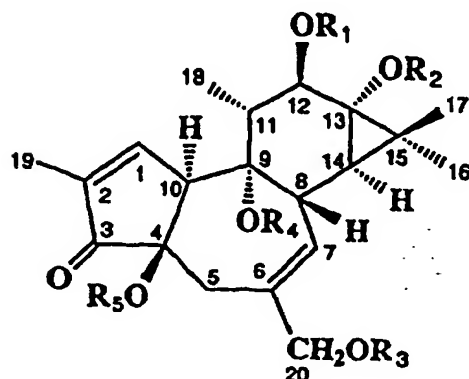
添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

(i) 次式 I :



(1)

〔式中、 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 及び R_5 は、互いに独立して、水素原子、脂肪族カルボン酸残基又は芳香族カルボン酸残基を表わす〕で表わされ、MT-4細胞におけるHIV-1による細胞病原性効果(CPE)を100%阻害する濃度 IC_{100} と、細胞増殖試験によりMT-4細胞の生存を減少させる濃度 CC_0 との比 $r = CC_0 / IC_{100}$ が2以上であり、且つ濃度10 ng/mLにおけるプロテインキナーゼC(PKC)の活性化が30%以下であるホルボール誘導体と、(ii)ウイルスの複製過程又は成熟過程を抑制又は阻害する薬剤、とを有効成分として含む抗ウイルス配合剤。本配合剤は、特にヒト免疫不全ウイルス(HIV)のようなウイルスに対して有効である。

明 細 書

ホルボール誘導体を主な有効成分とする抗ウイルス配合剤

技術分野

本発明は、抗ウイルス作用を有するホルボール誘導体を主な有効成分とし、更にウイルスの複製過程又は成熟過程の阻害剤、及び所望により他の薬剤、例えば、ホルボール誘導体以外の抗ウイルス作用を有する薬剤、前述の各種薬剤による副作用を抑制又は除去するための解毒剤を含む抗ウイルス配合剤、特にヒト免疫不全ウイルス（H I V）のようなウイルスに対して有効な抗ウイルス配合剤に関するものである。

背景技術

後天性免疫不全症候群（A I D S；エイズ）を引き起こす原因であるヒト免疫不全ウイルス（H I V）が発見されて以来、有効な抗H I V薬を開発するための研究がさかんに行われ、近年、この分野で著しい進歩が見られる。エイズ治療薬の研究開発においては、抗H I V作用を有する新規化学薬剤の研究開発以外に、天然の抗H I V作用を有する物質の探索も盛んに行われており、例えば、種々の化学構造を有する植物由来の化合物が、H I V－1の複製やそれにかかわる酵素を阻害することが報告されている（例えば、Che, 1991; Schinazi, 1992; Nasr, Craddock & Johnson, 1992; El-Mekkawy et al., 1995; El-Mekkawy, Meselhy, Kusumoto, Kadota, Hattori, Namba, 1998; Ng, Huang, Fong & Yeung, 1997; Kusumoto & Hattori, 1999参照）。

植物由来の生理活性物質は原料である植物から比較的容易に入手可能であり、また和漢薬や世界各地の民間治療薬の原料として使用される植物も多く、生理活性についての多量の情報の蓄積があることことから、有効な抗H I V薬としても大いに期待されている。

しかしながら、現在までに発見されている植物由来の抗H I V作用を有する物質は何れも活性が充分ではない。また、植物由来の前記物質のなかには毒性や発癌性などの有害な副作用を有するものもあるので、有用な生理活性と有害な生理活性とを勘案して、例えば抗H I V薬のような抗ウイルス剤として最適なものを選択することは非常に難しい。そのため、高い抗ウイルス作用（例えば、抗H I

V作用)を有し且つ有害な副作用が少ない前記物質の発見及びそれをベースとした有効な抗ウイルス剤、例えば抗H I V剤の開発が望まれていた。

本発明者らは、数百～千種類に及ぶ和漢薬や植物由来の天然原料に対してスクリーニングを行い、その抗ウイルス性を鋭意検討した結果、ハズの種に含まれる成分、特にホルボール誘導体、とりわけ特定のホルボール誘導体にエイズウイルスの増殖を強く抑制する効果があることを見出した。

ところで、現在の抗H I V療法においては、抗ウイルス剤を単独で使用するとは殆どなく、複数の薬剤を同時に用いる多剤併用療法が主流となっている。その背景には、エイズ治療に使用可能な逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤などを抗H I V薬として単独で使用した場合には、必ずしも十分な抗エイズウイルス効果が期待できないことがある。

すなわち、現在の抗H I V薬は、エイズウイルスの複製又は成熟を抑制又は阻止するに過ぎないので、エイズ治療では絶えずエイズウイルスの増殖を抑制又は阻止し続けなければならない。一方、エイズウイルスは逆転写を繰り返す毎に変異を起こすので、薬剤耐性が出現し易く、その結果、エイズウイルスの複製又は成熟を抑制又は阻止する機序による抗H I V薬は、臨床効果が減弱することが判っている。

前述の欠点を補うために、例えば、2種の逆転写酵素阻害剤を併用してウイルスの複製抑制を行う2剤併用療法が行われている。更に、2剤併用療法を用いても、長期投与により抗H I V薬に対するエイズウイルスの耐性が生じ、十分な治療効果が得られなくなった場合は、より強力な3剤併用療法、すなわち、例えば、ヌクレオシド系の逆転写酵素阻害剤2種+プロテアーゼ阻害剤1種による3剤併用療法が行われ、臨床試験によりその長期的効果が認められている。

抗H I V薬としては現在、逆転写酵素阻害薬及びプロテアーゼ阻害薬が市販されており、またインテグラーゼ阻害薬及びコレセプター薬などが開発されつつある。

このような現状において、以下に示すように、種々の阻害剤、抗ウイルス剤、前記阻害剤や抗ウイルス剤に対する解毒剤が提案されている。

阻害剤関連：例えば、特開平5-279329号公報(内部ラクタム環を有す

るH I Vプロテアーゼ阻害剤)、特開平5-331067号公報(レトロウイルスプロテアーゼの阻害剤)、特開平6-25158号公報(置換ピロリジン誘導体及びH I Vプロテアーゼ阻害剤)、特開平6-73004号公報(置換ビペコリン酸誘導体及びH I Vプロテアーゼ阻害剤)、特開平7-285877号公報(H I V-1の逆転写酵素阻害剤)、並びに特開平11-322789号公報(アミノ酸誘導体)。

抗ウイルス剤関連:例えば、特開平5-97888号公報(新規オキセタノシン誘導体、その塩及び抗ウイルス剤)、特開平6-56825号公報(ベンゾジアゼピン類)、特開平6-234641号公報(抗ウイルス組合せ)、特開平6-316524号公報(抗エイズウイルス剤)、並びに特開平7-82292号公報(新規なグリチルレチン酸関連化合物又はそれらの塩)。

解毒剤関連:例えば、特開平9-30974号公報(エイズウイルス抑制剤等の毒性、副作用の消除法とその製造方法)。

抗H I V薬の作用機序に関しては、H I Vが正常宿主細胞(ヒトのC D 4陽性Tリンパ球やマクロファージ)に結合した後、続く感染細胞中での複製から成熟するまでの過程において、いくつかの作用点が考えられている。以下、図1、2に基づいて、H I Vウイルスの複製及び成熟過程について簡単に説明する。

図1にH I Vウイルスの概略構造を示す。ウイルス殻1は脂質二重膜2からなり、その表面に、マトリックス・蛋白質(MA)とgp41とgp120とからなる構造体を有している。ウイルス殻1の内部には、コア・蛋白質(CA)、ヌクレオキャプシド・蛋白質(NC)、RNA、逆転写酵素3、インテグラーゼ4及びプロテアーゼ5などが存在する。

図1に示す構造を有するH I Vウイルスは、図2に示す機序により複製され、成熟する。図2において、エンベロープ(ウイルス殻1)を持ったウイルス粒子は、特異的な細胞膜分子(受容体;ケモカインレセプター及びC D 4)に結合する〔過程①〕。次いで、エンベロープを利用して細胞膜に融合して〔過程②〕、細胞内に侵入する。脱殻した〔過程③〕ウイルスは自らの逆転写酵素によってRNAを逆転写して〔過程④〕DNAを複製し、複製されたDNAは細胞核内へ移行する〔過程⑤〕。細胞核内のDNAはインテグラーゼによって組み込まれ〔過

程⑥〕、プロウイルスとなる。更に、H I Vの遺伝子情報が増幅転写され、H I Vの蛋白質がH I Vウイルスの有するプロテアーゼの働きで合成され〔過程⑦〕、コアー蛋白質の集合〔過程⑧〕と、エンベロープの会合〔過程⑨〕が行われて、感染性ウイルス粒子の成熟〔過程⑩〕が完了する。また、結合－成熟の過程でウイルスを抑制する未知の作用部位又は作用機序〔過程⑪〕が考えられている。トランスゴルジ網によるH I Vウイルスの形成、放出及び成熟〔過程⑫、⑬及び⑭〕も行われる。

現在のエイズ治療においては、図2に示す機序におけるH I Vウイルスの細胞膜への結合からDNAの組み込みまでの前記過程において、RNAをDNAに転写する逆転写酵素を阻害する〔過程④を阻害する〕薬剤と、プロウイルスが成熟するまでの後期過程において、コアー蛋白質の合成に関与するプロテアーゼを阻害する〔過程⑦を阻害する〕薬剤の2種が抗H I V薬の中心であり、これらの薬剤を2剤以上を組み合わせた多剤併用療法が試みられている。

一方、前記の特定のホルボール誘導体は、逆転写酵素の阻害及びプロテアーゼの阻害という前述の二つの代表的な抗H I V作用を有せず、別の機序による抗H I V作用、すなわち、H I Vウイルスが宿主細胞と結合して融合するまでの過程を阻害する〔過程①及び過程②を阻害する〕ことによる抗H I V作用を有するものと考えられる。

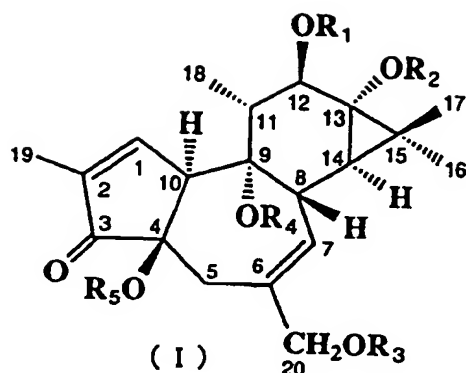
従って、特定のホルボール誘導体と前述の各種阻害剤（又は従来の抗H I V薬）1種以上とを組み合わせれば、すなわち、このような構成を有するいわゆるカクテル製剤を用いれば、このカクテル製剤は、H I Vウイルスの複製又は成熟に関する複数の過程に同時に作用するので、従来の抗H I V薬に比べて一層強い抗H I V作用を有することが予想される。

本発明は、前述のような観点に基づいて成されたものであり、その目的とするところは、従来から知られている抗ウイルス剤に比べて一層高い抗ウイルス作用を有し、且つ有害な副作用が少ない抗ウイルス剤（例えば抗H I V剤）を提供することにある。

発明の開示

本第一の発明の抗ウイルス配合剤は、

(i) 次式 I :



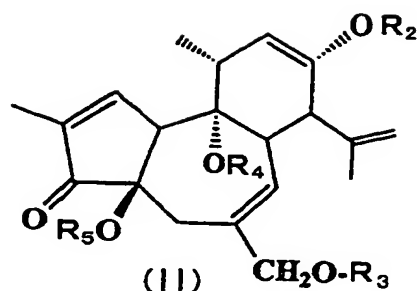
〔式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、互いに独立して、水素原子、脂肪族カルボン酸残基又は芳香族カルボン酸残基を表わす〕で表わされ、

MT-4 細胞における HIV-1 による細胞病理性効果 (CPE) を 100% 阻害する濃度 IC_{100} と、細胞増殖試験により MT-4 細胞の生存を減少させる濃度 CC_{50} との比 $r = CC_{50} / IC_{100}$ が 2 以上であり、且つ濃度 10 ng/mL におけるプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化が 30% 以下であるホルボール誘導体と、

(ii) ウイルスの複製過程又は成熟過程を抑制又は阻害する薬剤、
とを有効成分として含むことを特徴とする。

本第二の発明の抗ウイルス配合剤は、

(i) 次式II:



〔式中、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、互いに独立して、水素原子、脂肪族カルボン酸残基又は芳香族カルボン酸残基を表わす〕で表わされ、

MT-4 細胞における HIV-1 による細胞病原性効果 (CPE) を 100% 阻害する濃度 IC_{100} と、細胞増殖試験により MT-4 細胞の生存を減少させる濃度 CC_0 との比 $r = CC_0 / IC_{100}$ が 2 以上であり、且つ濃度 10 ng/mL におけるプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化が 30% 以下であるホルボール誘導体と、

(ii) ウイルスの複製過程又は成熟過程を抑制又は阻害する薬剤、
とを有効成分として含むことを特徴とする。

本第三の発明の抗ウイルス配合剤は、

A) 以下の群:

(iii) 本第一の発明の抗ウイルス配合剤、及び

(iv) 本第二の発明の抗ウイルス配合剤、

から選択された少なくとも 1 種の抗ウイルス配合剤、
並びに

B) 以下の群:

(v) ウイルスの複製過程又は成熟過程の何れかを抑制又は阻害する薬剤に対する
解毒剤、及び

(vi) 前記式 I 又は前記式 II で表わされるホルボール誘導体以外の他の抗ウイルス

剤、

(vii) 抗ウイルス剤に対する解毒剤、
から選択された少なくとも1種の薬剤
を含むことを特徴とする。

本第一の発明の抗ウイルス配合剤において、前記式 I で表わされるホルボール誘導体が式 I [式中、 R_1 、 R_4 及び R_5 は水素原子を表わし、 R_2 はアセチル基を表わし、 R_3 はリノール酸残基を表わし；又は R_1 、 R_4 及び R_5 は水素原子を表わし、 R_2 はチグロイル基を表わし、 R_3 はリノール酸残基を表わし；又は R_1 はアセチル基を表わし、 R_2 はチグロイル基を表わし、 R_3 、 R_4 及び R_5 は水素原子を表わし；又は R_1 はデカノイル基を表わし、 R_2 は2-メチル酪酸残基を表わし、 R_3 、 R_4 及び R_5 は水素原子を表わし；又は R_1 はチグロイル基を表わし、 R_2 は2-メチル酪酸残基を表わし、 R_3 、 R_4 及び R_5 は水素原子を表わす] で表わされるホルボール誘導体であるものが好ましい。

また、本第一又は第二の発明の抗ウイルス配合剤において、ウイルスの複製過程又は成熟過程を抑制又は阻害する薬剤が、以下の群：

- (1) ウイルスと細胞膜との結合を抑制する薬剤、
 - (2) ウイルスと細胞膜との融合を抑制する薬剤、
 - (3) 逆転写酵素阻害剤、
 - (4) インテグラーゼを介したDNAの組み込みを阻害する薬剤、
 - (5) プロウイルスの転写を抑制する薬剤、
 - (6) プロテアーゼを介したコア-蛋白質の合成を阻害する薬剤、
 - (7) コア-蛋白質の集合とパッケージングを抑制する薬剤、
 - (8) コア-蛋白質と殻外蛋白質の会合を抑制する薬剤、
 - (9) 細胞膜から遊離脱出した感染性のウイルス粒子の成熟を抑制する薬剤、及び
 - (10) 結合から成熟までの過程でウイルスの成熟に関わる因子を抑制する薬剤、
- から選択された少なくとも1種の薬剤であるものが好ましい。

<抗ウイルス作用を有するホルボール誘導体の検討の経緯>

以下、説明の都合上、主としてHIVについて述べる。

本発明者らは天然のエイズ治療薬を探索する過程で、抗HIV作用を指標に種

々のエジプト民間薬を探索し、クロトン・チグリウム (*Croton tiglium*) 種子〔種子の生薬名：ハズ（巴豆）〕のメタノールエキス及び水エキスが細胞毒性濃度（選択インデックスは各々 34.4, 50.0）より低い濃度（ IC_{50} は各々 0.025 と 2.0 $\mu\text{g/mL}$ ）で MT-4 細胞での HIV の増殖及び細胞病原性効果（CPE）を阻害することを見出した (Kawahata, Otake, Mori, Morimoto, Ueba, Kusumoto et al., 1996)。クロトン・チグリウムはトウダイグサ科に属し、チグリアン型のホルボールエステルを含有していることが知られている。更にこれらの化合物はさまざまな生物学的、生化学的な効果を惹起することが示されている（例えば、Evan & Taylor, 1983; Evans & Soper, 1978; De Chaffoy de Courcelles, Roevens & van Belle, 1984; Hecker, 1978; Blumberg, 1980; Blumberg 1981; Blumberg; 1988; Kupchan, Uchida, Branfman, Daly & Yu-Fei, 1979; Gustafson, Cardellina II, McMabon, Gulakowski, Ishitoya, Szallasi et al., 1992; Gschwendt & Hecker, 1974 参照）。

すなわち発癌プロモーション、細胞増殖、血小板凝集、抗癌、抗 HIV-1 効果などである。これらの効果は 12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート [12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate]（化合物 8, TPA）のようなホルボールエステルの発癌プロモーション作用や血小板凝集作用に関する研究から、どの様に細胞内に伝達されるかも明らかにされている。発癌プロモーター作用はこれらの化合物の利用に障害となるが、しかし、発癌プロモーター作用の無い多くのホルボールエステルも存在する。

クロトン・オイルから単離された 12-O-チグロイルホルボール-13-デカノエート [12-O-Tigloylphorbol-13-decanoate] はマウスの P-388 白血病に対して抗白血病活性を示す (Kupchan et al., 1979)。抗 HIV 活性を有する 12-デオキシホルボール-13-アセテート [12-Deoxyphorbol-13-acetate] はサモア島に生育する植物、ホマランツス・ヌタンス (*Homalanthus nutans*) から単離されている (Gustafan et al., 1992)。構造的にはこの化合物もホルボールエステルに属するが、発癌プロモーター効果が低いことが報告されている。しかし、ユーホルビア・トリアングラリス (*Euphorbia triangularis*) から単離された 12-デオキシホルボール-13-テトラデカノエート [12-Deoxyphorbol-13-tetra

decanoate) は T P A と同じ様に発癌プロモーター活性を持っている (Gschwendt et al., 1974) 。これら化合物が発癌プロモーション、抗癌と抗 H I V などの異なった効果を示すことは化合物の分子構造と関連があり、この構造上の特徴がこれら種々の効果を引き起こすものと思われる。

これらの化合物は一般的にはプロテインキナーゼ C (P K C) と相互作用し、P K C を活性化する。この作用は発癌プロモーションを引き起こすものと考えられている (例えば、Nishizuka, 1984; Nishizuka, 1986; Nishizuka, 1988; Bell, 1986; Weinstein, 1988; Rahmsdorf & Herrlich, 1990; Raineri, Simsiman & Boutwell, 1973; Castagna, Takai, Kaikuchi, Sano, Kikkawa & Nishizuka, 1982; Chowdhury, Koyagi, Kobayashi, Hamamoto, Yoshiyama, Yoshida et al., 1990; Keenan, Long & Kelleher, 1997 参照) 。

本発明者らはクロトン・チグリウム種子のメタノールエキスを 8 種のホルボールジエステルを単離し、更に単離した化合物の化学修飾を行い、また他のホルボール誘導体を調製し、これら種々のホルボール誘導体の H I V 阻害活性及び P K C 活性化作用を指標として、抗ウイルス剤としての有用性について検討した。そして、これらの化合物の構造と活性との相関から、P K C の活性化の程度が小さく且つ H I V - 1 による C P E の選択的阻害に必要な構造的特徴を見出した。本発明で使用し得るホルボール誘導体は、今後、抗 H I V - 1 作用を含む更に強い抗ウイルス作用を有する種々のホルボール誘導体をデザインする上での分子構造的な情報を提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、H I V ウイルスの概略構造を示す図である。

図 2 は、H I V ウイルスの複製過程又は成熟過程の機序を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

前記式 I 又は式 II で表わされるホルボール誘導体は、本発明の抗ウイルス配合剤の第一成分である。

前記式 I で表わされるホルボール誘導体において、R₁ , R₂ , R₃ , R₄ 及び R₅ は、互いに独立して、定義された範囲内の基を表わす。脂肪族カルボン酸残基又は芳香族カルボン酸残基とは、一般式 R C O O H で表わされる脂肪族又は

芳香族カルボン酸（式中、Rは脂肪族基又は芳香族基を表わす）からOH部分を除いたRCO部分を表わし、具体的には、例えば、アセチル基、ベンジル基、チグロイル基等であってよい。

前記式IIで表わされるホルボール誘導体は式Iで表わされるホルボール誘導体から更に誘導することができ（三員環部分が開環したものの誘導体に相当する）、式II中、R₂、R₃、R₄及びR₅は、式Iにおいて定義されたものと同じ意味を表わす。

前記式I又は式IIで表わされるホルボール誘導体は優れた抗ウイルス作用を有するものが多く、それ故、これらは本抗ウイルス配合剤、例えば抗HIV剤の有効成分として使用し得る。しかしながら、式Iで表わされるホルボール誘導体には抗ウイルス作用の小さいものや有害な副作用が大きいものが含まれるため、前述の $r = \text{CC}_0 / \text{IC}_{50}$ が2以上であることを第一の評価基準として抗ウイルス作用が所定以上であるものを選択し、また、前述のプロテインキナーゼC（PKC）の活性化が30%以下であることを第二の評価基準として有害な副作用が所定以下であるものを選択する。

前述の如く、ホルボール誘導体の中には強い発癌プロモーター作用を有するものもあるので、置換基の選択や化学構造の一部改変を通して、抗ウイルス作用は強いが発癌プロモーター作用などの有害な作用は弱いホルボール誘導体を適宜選択する必要がある。

ウイルスの複製過程又は成熟過程を抑制又は阻害する薬剤は本発明の抗ウイルス配合剤の第二成分であり、具体的には、前述の(1)～(10)の薬剤を単独又は組み合わせて使用する。(1)～(10)の薬剤は、本発明の抗ウイルス配合剤の使用目的に応じて適宜選択してよい。なお、前記(1)、(2)の薬剤は、前記式I及び前記式IIで表わされるホルボール誘導体と作用機序が同一である可能性があるが、前記式I及び前記式IIで表わされるホルボール誘導体以外の薬剤を選択すれば、すなわち化合物として前記ホルボール誘導体と異なれば、相乗的に作用する可能性があるので、使用し得ると考えられる。

本発明の抗ウイルス配合剤を抗HIV薬として使用する場合は、前述の(1)～(10)の薬剤のうちで、例えば、(3)の逆転写酵素阻害剤や(6)のプロテアーゼを

介したコア-蛋白質の合成を阻害する薬剤を用いることができる。

具体的には、例えば、(3) の逆転写酵素阻害剤は、例えば、ジドブジン (AZT)、ジダノシン (ddI)、ザルシタピン (ddC)、ラミブジン (3TC)、サニルブジン (d4T)、アバカビル (ABC)、ジドブジン・ラミブジン製剤 (AZT・3TC)、ネビラピン (NVP)、エファビレンツ (EFV)、 $N' - [1(S) - \text{ベンジル} - 3 - [4a(S), 8a(S), 3(S) - \text{第三ブチルカルバモイル}] \text{デカヒドロイソキノリン} - 2 - \text{イル}] - 2(R) - \text{ヒドロキシプロピル} -] - N'' - (\text{キノリン} - 2 - \text{イルカルバモイル}) - L - \text{アスパラギンアミド (Ro31-8959)}$ 又は (+) - S - 4, 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 5 - メチル - 6 - (3 - メチル - 2 - プテニル) イミダゾ [4, 5, 1 - j k] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 2 (1H) - チオン (R-82913, TIBO)、又はそれらの薬学上許容され得る誘導体である。

また、(6) のプロテアーゼを介したコア-蛋白質の合成を阻害する薬剤は、例えば、インジナビル (IDV)、サキナビル (SQV)、リトナビル (RTV)、ネルフィナビル (NFV) 又はアンブレナビル (APV)、又はそれらの薬学上許容され得る誘導体である。

本発明の抗ウイルス配合剤は、実際の使用形態に応じて種々の変形が可能である。例えば、本第三の発明の抗ウイルス配合剤における如く、本第一の発明の抗ウイルス配合剤と本第二の発明の抗ウイルス配合剤とを、適当な比率でブレンドして用いてもよい。また、複数のウイルスに対する作用を望む場合、具体的には、例えば、HIVウイルスに加えて、他のウイルスにも汚染された物の滅菌や、HIVウイルスに加えて、他のウイルスにも感染した患者の治療を行う場合には、更に、本第一及び第二の発明の抗ウイルス配合剤に含まれる抗ウイルス剤以外の他の抗ウイルス剤、例えば、ジデオキシアデノシン (DDA)、フォスカネットなどを併用してもよい。

他種類の薬剤を併用する場合には、前記薬剤の副作用が問題となる場合もあるので、この場合には適当な解毒剤、すなわち、ウイルスの増殖過程又は成熟過程の何れかを抑制又は阻害する薬剤に対する解毒剤、前記式 I 又は式 II で表わされるホルボール誘導体やそれ以外の他の抗ウイルス剤に対する解毒剤を更にブレンドして用いることができる。

本発明の抗ウイルス配合剤は、好適であれば、各種の用途に用いてよい。前記用途は、例えば、ウイルス性の疾患を患う人間や人間以外の動物の治療、ウイルスに汚染された物の滅菌、ウイルスに汚染され得るものへの予防的適用（塗布、噴霧、散布、等）などである。また、本発明の抗ウイルス配合剤の使用形態は用途に応じて適宜選択してよい。例えば、本発明の抗ウイルス配合剤の使用形態は、粉剤、顆粒剤、錠剤、溶液剤、乳化剤、分散剤、ペースト等であってよい。

<実施例>

以下の実施例において、本発明の抗ウイルス配合剤の成分(i)に関する「実施例」の部と「結果と考察」の部、本発明の抗ウイルス配合剤の成分(ii)に関する部、本発明の抗ウイルス配合剤の製造の部、及び本発明の抗ウイルス配合剤の作用機序の部に分けて、本発明を更に詳細に説明する。

本発明の抗ウイルス配合剤の成分(i) について

1. 実験

a) 機器分析

旋光度はDIP-360自動旋光度計(JASCO, Kyoto, Japan)で測定した。赤外吸収スペクトルはFT/IR-230分光光度計(JASCO, Kyoto, Japan)で記録した。紫外吸収スペクトルはUV-2200 UV-VIS分光光度計(Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いて測定した。NMRスペクトルはVarian Unity plus 500 (^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125 MHz)分光計で計測し、化学シフト(δ)はテトラメチルシラン(TMS)を標準として表わした。電子衝撃(EI)マススペクトルはJMS-AX505HAD分光計(JEOL)を使用し、70 eVで測定した。大気圧イオン化(API)マススペクトルはPESCIEX APIII生体分子質量分析計で測定した。

b) クロマトグラフィー

i) TLC

60F₂₅₄ RP-18F₂₅₄のシリカゲルプレート(Merck, Darmstadt, Germany); スポットはUV、或いはアニスアルデヒド-硫酸を噴霧した後加熱し、検出した。

ロ) カラムクロマトグラフィー

シリカゲル 60 (70-230 mesh, Merk)、ODS Cosmosil 140 C18-OPN (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)。

ハ) 中圧速液体クロマトグラフィー (MPLC)

LiChroprep Si 60 カラム或いは LiChroprep RP-18 カラムを用いて行った (A size, Merck, Darmstadt)。

ニ) ガスクロマトグラフィー・マススペクトル (GC-MS)

DB-1 カラム [0.25 mm (i. d) × 30 mm] (J & W Scientific, USA) を装備した GC-17A ガスクロマトグラフ (Shimadzu, Kyoto, Japan) とオートマス・システム II 卓上型四重極マススペクトル計 (JEOL, Japan) を用いて得られた。条件: カラム温度 50℃、10分、後は20分間に250℃まで徐々に上昇 (10℃/min); 注入温度 250℃、或いは30℃の等温で30分 (鎖の短い脂肪酸のメチルエステルは170℃); 担体ガス、He (流速 15 mL/min)。

c) 実験材料

クロトン・チグリウム種子はカイロ (エジプト) のハラズ (Harraz) 薬草店から購入し、エジプト・カイロ大学薬学部のエルーセイド・イー・アブタブル (El-Sayed E. Aboutabl) 教授により同定された。この標品は富山医科薬科大学資料館に保存されている。

d) 試薬と酵素

何れも、この分野で慣用のものを使用した。

e) 化合物 1~8 の単離

風乾した種子 (3 kg) を電気粉砕機で均一にし、メタノール (10 L × 3) で3時間還流した後、メタノール溶液を集めて減圧濃縮し、763 g の油状抽出物を得た。この抽出物を90%メタノール (7 L) に懸濁した後、ヘキサン、次いでエーテルで抽出した (各 4 L, 3回)。エーテル溶液を集め、減圧濃縮して樹脂状物質を得た (150 g)。これについて、シリカゲルカラム (2 kg) を用いてクロマトグラフィーを行った。すなわち、ヘキサン (5 L) で洗浄後、まずヘキサン-酢酸エチル (9:1 → 6:4)、後クロロホルム-メタノール (9:1, 8:2, 7:3) で溶出し、20のフラクション (Fr. 1~Fr. 20

）を得た。MPLC (RP-18, メタノール-水, 9.5 : 0.1) を使用して、Fr. 13 をカラムクロマトグラフィーに付し、13-オチグロイルホルボール-20-(9Z, 12Z-オクタデカジエノエート) [13-O-Tigloylphorbol-20-(9Z, 12Z-octadecadienoate)] (化合物2; 60 mg) を得た。Fr. 17 は RP-2 カラムに負荷しメタノール-水 (9 : 1) で溶出し、Fr. 17-A (683 mg) と Fr. 17-B (217 mg) を得た。MPLC を用いて、Fr. 17-A から 13-オアセチルホルボール-20-(9Z, 12Z-オクタデカジエノエート) [13-O-Acetylphorbol-20-(9Z, 12Z-octadecadienoate)] (化合物1; 153 mg)、Fr. 17-B から 12-オデカノイルホルボール-13-(2-メチルブチレート) [12-O-Decanoylphorbol-13-(2-methylbutyrate)] (化合物4; 21 mg) 及び 12-オ-(2-メチルブチロイル)ホルボール-13-ドデカノエート [12-O-(2-Methylbutyryl)phorbol-13-dodecanoate] (化合物7; 30 mg) を得た。Fr. 18~20 の一部 (1 g) をカラムクロマトグラフィー (RP-2, メタノール-水, 6.4) に付し、更にサブフラクション (I~X) に分画した。メタノール-水を用いて MPLC (RP-18) を行い、Fr. III (8 : 2), Fr. V (9 : 1) 及び Fr. VI からそれぞれ 12-オアセチルホルボール-13-チグリエート [12-O-Acetylphorbol-13-tiglate] (化合物3; 35 mg), 12-オアセチルホルボール-13-デカノエート [12-O-Acetylphorbol-13-decanoate] (化合物6; 74 mg) 及び 12-オデカノイルホルボール-13-(2-メチルブチレート) [12-O-Decanoylphorbol-13-(2-methylbutyrate)] (化合物4; 57 mg) を得た。同様にメタノール-アセトニトリル (4 : 6) で溶出し、Fr. IX から 12-オチグロイルホルボール-13-(2-メチルブチレート) [12-O-Tigloylphorbol-13-(2-methylbutyrate)] (化合物5; 12 mg) を得た。またメタノール-水 (9.4 : 0.6) で溶出し、Fr. X から 12-オデカノイルホルボール-13-アセテート [12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate] (化合物8; 110 mg) を得た。前記化合物1~8のうち、化合物1~5は新規化合物である。

f) ホルボール類 (化合物9, 19 及び 20) の調製

文献に従い、Fr. 8～20 (40 mg) を水酸化バリウム (2.2% メタノール溶液, 400 mL) と混合し、室温、アルゴン中で1時間攪拌し、粗ホルボールフラクションを得た (Mishra, Estensen & Abdel-Monem, 1986; Cairnes, Mirvis h, Wallcave, Nagei & Smith, 1981)。このフラクションについてクロロホルム-メタノール (9.5:0.5, 7:3) を用いてシリカカラムクロマトグラフィーを行ない、次いでMPLC (RP-18, メタノール-水 4:6) によって精製し、ホルボール [Phorbol] (化合物 9; 537 mg)、4 α -ホルボール (又はイソホルボール) [4 α -Phorbol, isophorbol] (化合物 19; 185 mg) (Hecker, 1966; Tseng et al., 1977; Evans et al., 1973; Hecker et al., 1976) 及び4-デオキシ-4 α -ホルボール [4-deoxy-4 α -phorbol] (化合物 20; 10 mg) (Furstenberger & Hecker, 1977) を得た。

g) 各種ホルボール誘導体 (化合物 10～18 及び 21～24) の合成

ホルボールエステルの構造-活性相関を調べるため、ホルボール (化合物 9) 及びイソホルボール (化合物 19) から種々の誘導体を合成した。すなわち HClO₄ による 13-O-アセチルホルボール-20- (9Z, 12Z-オクタデカジエノエート) (化合物 1) の選択的加水分解により 13-O-アセチルホルボール [13-O-Acetylphorbol] (化合物 10) が得られ (Zayed, Sorg & Hecker, 1984)、また化合物 1 を無水酢酸/ピリジン中で室温で 24 時間処理してホルボール-12, 13-ジアセテート-20-リノレート [Phorbol-12, 13-diacetate-20-linoleate] (化合物 13) を得た。前記化合物 1 とメシルクロライドをピリジン中、室温で 21 時間反応させることにより 13-O-アセチルクロトホルボロン-エノール-20-リノレート [13-O-Acetylcrotophorbolone-enol-20-linoleate] (化合物 18) を得た (Bartsch et al., 1969)。アセチル化により 12-O-デカノイルホルボール-13-アセテート (化合物 8) から 12-O-テトラデカノイルホルボール-13, 20-ジアセテート [12-O-Tetradecanoylphorbol-13, 20-diacetate] (化合物 14) を得、イソホルボール (化合物 19) から 4 α -ホルボール-12, 13, 20-トリアセテート [4 α -Phorbol-12, 13, 20-triacetate] (化合物 21) 及び 4 α -ホルボール-4, 12, 13, 20-テトラアセテート [4 α -Phorbol-4, 12, 13, 20-triacetate] (化合物 23) を得た。

を得た(Hecker, Harle, Schairer, Jacobi, Hoppe & Gassmann, 1968)。また前記化合物 9 を 90℃ / 1 h の条件でアセチル化することによりホルボール-12, 13, 20-トリアセテート [Phorbol-12, 13, 20-triacetate] (化合物 11) を得た(Hecker et al., 1965; Hecker et al., 1966)。前記化合物 21 を紫外線で照射し (254 nm, 5 h)、ルミホルボール-12, 13, 20-トリアセテート [Lumiphorbol-12, 13, 20-triacetate] (化合物 24) を得た(Hecker et al., 1968)。前記化合物 11 を NaBH_4 により還元し、3-デオキシ-3 β -ヒドロキシホルボール-12, 13, 20-トリアセテート [3-Deoxo-3 β -hydroxyphorbol-12, 13, 20-triacetate] (化合物 15) を得た(Hecker et al., 1967)。そして前記化合物 15 に対して室温で 20 時間、DMF の中で $\text{Ag}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{I}$ によるメチル化を行い、4-O-メチルホルボール-12, 13, 20-トリアセテート [4-O-Methylphorbol-12, 13, 20-triacetate] (化合物 16) を得た(Bartsch et al., 1968)。前記化合物 11 を無水酢酸 / P-トルエンスルホン酸処理することによりホルボール-4, 9, 12, 13, 20-ペンタアセテート [Phorbol-4, 9, 12, 13, 20-pentaacetate] (化合物 17) を合成した(Hecker et al., 1966)。前記化合物 9 とベンゾイルクロライド / ピリジンとの反応によりホルボール-12, 13, 20-トリベンゾエート [Phorbol-12, 13, 20-tribenzoate] (化合物 12) を得た(Hecker et al., 1966; Crombe et al., 1968)。前記化合物 19 とブチリルクロライド / ピリジンとの反応により 4 α -ホルボール-12, 13, 20-トリブチレート [4 α -Phorbol-4, 12, 13, 20-tributyrate] (化合物 22) を得た。これら誘導体の合成は文献に基づき、生成物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーの後、LiChroprep RP-18 MPLC で精製した。

前記 e) ~ g) において製造した各種ホルボール誘導体の名称及び化合物 No を下記表 1 にまとめて示す。

表 1 : 種々のホルボール誘導体

| ホルボール誘導体の名称 | No |
|----------------------------------|----|
| 13-O-アセチルホルボール-20-(9Z, 12Z-オクタデカ | 1 |

| | |
|---|----|
| ジエノエート) | |
| 13-オ-チグロイルホルボール-20-(9Z, 12Z-オクタデ カジエノエート | 2 |
| 12-オ-アセチルホルボール-13-チグリエート | 3 |
| 12-オ-デカノイルホルボール-13-(2-メチルブチレート) | 4 |
| 12-オ-チグロイルホルボール-13-(2-メチルブチレート) | 5 |
| 12-オ-アセチルホルボール-13-デカノエート | 6 |
| 12-オ-(2-メチルブチロイル)ホルボール-13-ドデカノエ ート | 7 |
| 12-オ-デカノイルホルボール-13-アセテート | 8 |
| ホルボール | 9 |
| 13-オ-アセチルホルボール | 10 |
| ホルボール-12, 13, 20-トリアセテート | 11 |
| ホルボール-12, 13, 20-トリベンゾエート | 12 |
| ホルボール-12, 13-ジアセテート-20-リノレート | 13 |
| 12-オ-テトラデカノイルホルボール-13, 20-ジアセテート | 14 |

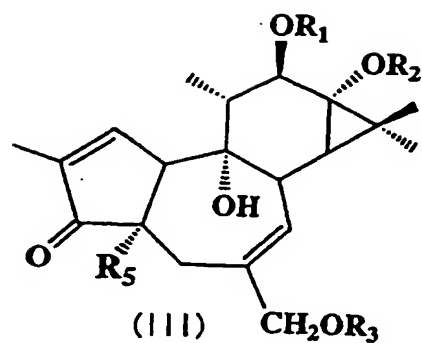
| | |
|---|----|
| 3-デオキシ-3 β -ヒドロキシホルボール-12, 13, 20-トリアセテート | 15 |
| 4-オ-メチルホルボール-12, 13, 20-トリアセテート | 16 |
| ホルボール-4, 9, 12, 13, 20-ペンタアセテート | 17 |
| 13-オ-アセチルクロトホルボロン-エノール-20-リノレート | 18 |
| 4 α -ホルボール (又はイソホルボール) | 19 |
| 4-デオキシ-4 α -ホルボール | 20 |
| 4 α -ホルボール-12, 13, 20-トリアセテート | 21 |
| 4 α -ホルボール-12, 13, 20-トリブチレート | 22 |
| 4 α -ホルボール-4, 12, 13, 20-テトラアセテート | 23 |
| ルミホルボール-12, 13, 20-トリアセテート | 24 |

ホルボール誘導体 1～24 の構造及び置換基を下記表 2 にまとめて示す。

ホルボール誘導体 1～17 : 前記式 I で表わされる化合物。

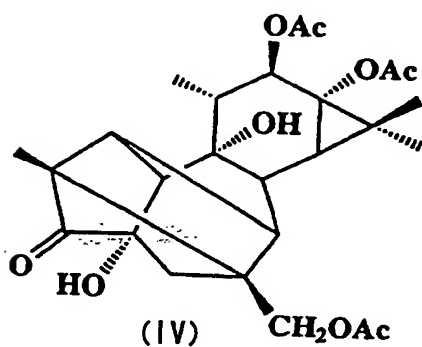
ホルボール誘導体 18 : 前記式 II で表わされる化合物。

ホルボール誘導体 19 ~ 23 : 次式III :



で表わされる化合物。

ホルボール誘導体 24 : 次式IV:



で表わされる化合物。

表 2 : 種々のホルボール誘導体の構造

| No | 式 | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ |
|----|---|----------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------|----------------|
| 1 | I | H | CH ₃ CO | C ₁₇ H ₃₁ CO | H | H |
| 2 | I | H | C ₄ H ₇ CO | C ₁₇ H ₃₁ CO | H | H |

| | | | | | | |
|----|-----|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|-----------------|
| 3 | I | CH ₃ CO | C ₄ H ₇ CO | H | H | H |
| 4 | I | C ₁₁ H ₁₃ CO | C ₄ H ₉ CO | H | H | H |
| 5 | I | C ₄ H ₇ CO | C ₄ H ₉ CO | H | H | H |
| 6 | I | CH ₃ CO | C ₉ H ₁₉ CO | H | H | H |
| 7 | I | C ₄ H ₉ CO | C ₁₁ H ₂₃ CO | H | H | H |
| 8 | I | C ₁₃ H ₂₇ CO | CH ₃ CO | H | H | H |
| 9 | I | H | H | H | H | H |
| 10 | I | H | CH ₃ CO | H | H | H |
| 11 | I | CH ₃ CO | CH ₃ CO | CH ₃ CO | H | H |
| 12 | I | C ₆ H ₅ CO | C ₆ H ₅ CO | C ₆ H ₅ CO | H | H |
| 13 | I | CH ₃ CO | CH ₃ CO | C ₁₇ H ₃₁ CO | H | H |
| 14 | I | C ₁₃ H ₂₇ CO | CH ₃ CO | CH ₃ CO | H | H |
| 15 | I * | CH ₃ CO | CH ₃ CO | CH ₃ CO | H | H |
| 16 | I | CH ₃ CO | CH ₃ CO | CH ₃ CO | H | CH ₃ |
| | | | | | | |

| | | | | | | |
|----|-----|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------|---------------------|
| 17 | I | CH ₃ CO | CH ₃ CO | CH ₃ CO | CH ₃ CO | CH ₃ CO |
| 18 | II | — | CH ₃ CO | C ₁₇ H ₃₁ CO | H | H |
| 19 | III | H | H | H | — | OH |
| 20 | III | H | H | H | — | H |
| 21 | III | CH ₃ CO | CH ₃ CO | CH ₃ CO | — | OH |
| 22 | III | C ₃ H ₇ CO | C ₃ H ₇ CO | C ₃ H ₇ CO | — | OH |
| 23 | III | CH ₃ CO | CH ₃ CO | CH ₃ CO | — | CH ₃ COO |
| 24 | IV | — | — | — | — | — |

I* : 3-デオキソ-3β-ヒドロキシ誘導体

h) 細胞

実験にはMT-4細胞を用いた。細胞は37℃、5%CO₂の条件下で、10%ウシ胎児血清(FCS, Flow laboratories, North Ryde, Australia)、100μg/mLストレプトマイシン(Meiji Seika, Tokyo, Japan)と100U/mLのペニシリンG(Banyu Pharmaceutical, Tokyo, Japan)を添加したRPMI-1640培地で培養した(Flow Laboratories Irvine, Scotland)。

i) ウイルス

HIV-1はLAV-1が持続感染したMOLT-4細胞の培地上層液から得た。

j) MT-4細胞におけるHIV-1による細胞病原性効果(CPE)の誘発

各種化合物のHIV-1による細胞病原性に対する阻害活性はHarada, Koyanagi & Yamamoto(1985)の方法で測定した。MT-4細胞にHIV-1(0.001

／ウェルのTCID₅₀)を1時間感染させた後、未吸着ウイルスを洗浄し、除去した。次いで、細胞をRPMI-1640培地に 1.5×10^5 cell/mLの濃度で再び懸濁した。96穴の培養プレートで200 μ L／ウェルの細胞懸濁液と各種濃度(12 dose, 最大1000 μ g/mL, 最小0.49 μ g/mL)の被検化合物を5日間培養した。コントロールは化合物を添加せず、HIV-1感染或いは未感染培地で行った。5日後、光学顕微鏡を用いてHIV-1誘発CPEを観察し、完全に阻害する化合物のIC₁₀₀を決定した。更に細胞増殖試験によりMT-4細胞の生存を減少させる濃度CC₅₀を求めた。

k) 化合物1～24によるプロテインキナーゼCの活性化

TPAの代わりに、DMSOに溶かした化合物1～24(2.7 μ g/mL及び10 ng/mL)(DMSOの最後濃度は0.02%以下)を使用して、バイオトラック・ピーケイシー(Biotrak PKC) 酵素アッセイ・システム(code RPN 77 kit)で測定した。Arg-Lys-Arg-Thr-Leu-Arg-Leu-OHに取り込まれた[γ -³²P] ATPの放射能からPKCの活性化度を求めた。総量55 mLの反応混合物はPKC 2ミリ単位、トリス／塩酸(pH 7.5) 50 mM、0.13% w/vメルカプトエタノール、2.1 mM EDTA、4.18 mM EDTA、20.9 μ g/mL PMSF、4.2 mMベンザミジン、1.4 nM酢酸カルシウム、75 mMペプチド、34 μ g/mL L- α -ホスファチジル-L-セリン、3.4 mM DTT、0.68 mMアジ化ナトリウム、及び6.5 nM MgCl₂などを含む。

0.55 nM [γ -³²P] ATP (50×10^3 cpm/nmol)を添加した後、混合物を37℃で30分間反応させた。次いで10 mLの氷冷した停止試薬を添加し、反応を終結させた。35 mLの反応混合物をディスクの中央に加え、その10分間後、ディスクを75 mMリン酸で2回洗浄した。³²Pで標識された生成物の放射能は液体シンチレーションカウンターで測定した。TPA、脂質、塩化カルシウムの存在下、PKCの活性化は100%であり、8400 nmol/mg/minに相当した(陽性コントロール)。化合物1～24によるPKC活性化は2検体の平均値として、ポジティブコントロールを基に計算した。ブランク(PKC無添加)とコントロール(TPA或いは被検化合物の無添加)も

同様に行った。PKCの1単位は上記条件下、ATPからその基質であるペプチドに1分間で1nmolのリン酸が取り込まれる酵素量として定義した。34 μ g/mL L- α -ホスファチジル-L-セリンと2.7 μ g/mL TPAの存在下、PKCの活性化は180 nMのスタウロンスポリンにより完全に阻害された。

2. 結果と考察

a) クロトン・チグリウムからのホルボールジエステルの単離と同定

生物活性を指標にクロトン・チグリウム種子(巴豆)のメタノールエキスのエーテル可溶部分の分画を行い、HIV-1誘発CPEを阻害する8種のホルボールジエステル(化合物1~8)を単離した。これらの構造はNMRやMS等の分光学的方法やアシルグループを選択的加水分解を行った後、GC/MSでそれらの構造を明らかにすることにより決定した。化合物6~8は各々12-O-アセチルホルボール-13-デカノエート[12-O-Acetylphorol-13-decanoate](化合物6)、12-O-(2-メチルブチロイル)ホルボール-13-ドデカノエート[12-O-(2-Methylbutyroyl)phorbol-13-dodecanoate](化合物7)、及び12-O-デカノイルホルボール-13-アセテート[12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate](化合物8; TPA)と同定した(Hecker, 1971; Heckcr, 1974)。化合物1~5は植物由来の天然物としてこれまで報告されていない新規化合物であり、下記の様に構造決定した。

化合物1(API-MS, m/z 691 [M+Na]⁺は、赤外吸収スペクトル(ν_{max} 1650 cm^{-1})及び紫外吸収スペクトル(λ_{max} 243 nm)から分子中に α , β -共役カルボニルの存在を示した。¹H-¹HのCOSY, HMQC等の測定実験を行い、¹Hと¹³CのNMRスペクトルを検討した結果、H-1のシグナルは δ 7.58 (C-1は δ 160.4)、H-19は1.78 (C-19は δ 10.1)、C-13は208.7に現れ、6-8の化合物とパターンが類似していることが判った。 δ 174.0と δ 173.5に二つのエステルのカルボニル基のピークが見られた。C-13(δ 68.0)とC-20(δ 69.2; δ_H 4.46のH₂-20)の低磁場シフトはその二つの炭素原子にアシル基が結合していることを示している。化合物1のHMBCでH₂-20と δ

173.5のカルボニル炭素との間でロングレンジ相関が観測されることから、オクタデカジエノイル基がC-20に結合していることが示されている。この側鎖の9Zと12Zの配置は ^{13}C -NMR [δ 27.2に現われる $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$] から明らかとなった。更に、 HClO_4 による化合物1の加水分解により二つの生成物が得られた。その一つはモノエステル、10 (m/z 406 $[\text{M}]^+$, δ 4.00の H_2-20)、他はメチル化の後GC/MSにより9Z,12Z-octadecandienoic acid methyl ester (t_R 19.25 min, m/z 294 $[\text{M}]^+$)と判明した。H-1, H-7 (δ 5.70), H-8 (δ 3.20)及びH-10 (δ 3.14)の化学シフトはA/Bトランスの環結合に特徴的であった(Sakata, Kawazu & Mitsui, 1971; Ronlan & Wickbeg, 1970)。更に本発明者はH-1とH-10、H-18 (δ 1.05)とH-19 (δ 1.78)、並びに二つのH-5 (δ 2.25と δ 2.38)とH-8のNOESYを観測し、化合物1が13-O-アセチルホルボル-20-(9Z, 12Z-オクタデカジエノエート) [13-O-Acetylphorbol-20-(9Z, 12Z-octadecadienoate)] であると結論した。

化合物2 (API-MS, m/z 731 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) は化合物1とスペクトルのデーターが非常に類似していた。しかしながら、1のアセチル基の代わりにチグロイル基のシグナル [δ_H 6.87 (δ 138.7, $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-$, 128.1 (s, $\text{C}=\text{CH}$), 1.80と1.82 (δ 14.5, 10.1, $2 \times \text{CH}_3$)] を有していた。HMBCでもチグロイル基がC-13に結合していることが観測された。C-20に9Z, 12Z-オクタデカンジエノイル (9Z,12Z-octadecandienoyl) 基 (HClO_4 による選択的な加水分解、メチル化後GC/MSにより確認) が結合していた。そこで化合物2の構造は13-O-チグロイルホルボル-20-(9Z, 12Z-オクタデカジエノエート [13-O-Tigloylphorbol-20-(9Z, 12Z-octadecadienoate)]) と決定した。

NMRとMSのデーターから、化合物3 (EI-MS, m/z 488 $[\text{M}]^+$, 及び428と389の断片) は分子量が各々59と99 (実験の部に示したとおり) の二つのアシル基を有するホルボル-12, 13-ジエステルと推定した。HMBCとGC/MSの測定に基づき、C-12 (δ_H 5.43/ δ_C 76

6) にアセチル基 (δ_H 2.1, 3H, s)、C-13 (δ_C 65.7) にチグロイル基 [δ 6.85, C(CH₃)=CH のメチルプロトンのシグナル, δ 6.15 に現われる異性体のアングロイル基と異なる] (Evans et al., 1978) を有することが判明した。従って、化合物 3 は 12-O-アセチルホルボール-13-チグリエート [12-O-Acetylphorbol-13-tiglate] と決定した。

化合物 4 (EI-MS, m/z 602 [M]⁺) は化合物 6 と比べて 2-メチルブチリル基のシグナルが 6 のアセチル基に代わったことを除き、ほかのスペクトルデータはほとんど同じであった。0.1 M KOH/MeOH による選択的な加水分解の後、GC/MS により確認した生成物 2-メチル酪酸メチルエステル (2-methylbutyric acid methyl ester) (t_R 9.40 min, m/z 116 [M]⁺) は C-13 に 2-メチルブチリル基が結合していることを示していた。同様に 0.2 M NaOMe による加水分解後、GC/MS [デカン酸メチルエステル (decanoic acid methyl ester), t_R 10.16 min, m/z 186 [M]⁺] からデカノイル基 (decanoyl 基) が C-13 に結合していることが判った。化合物 4 は以前、植物から単離された化合物 (Evans et al., 1983; Hecker et al., 1974) の位置異性体で、12-O-デカノイルホルボール-13-(2-メチルブチレート) [12-O-Decanoylphorbol-13-(2-methylbutyrate)] と決定した。

化合物 4 と比べて、化合物 5 (EI-MS, m/z 530 [M]⁺) は C-12 にデカノイル基ではなく、チグロイル基が結合していた。HMBC と GC/MS を基にして、アシル基の結合部位を検討した結果、化合物 5 は以前にユーホルビア・フランキアナ・ベルガー (Euphorbia frankiana Berger) やイー・コエルレッセンス・ハウ (E. coerulescens Haw) から単離された化合物 (Evans et al., 1974) の位置異性体で、12-O-チグロイルホルボール-13-(2-メチルブチレート) [12-O-Tigloylphorbol-13-(2-methylbutyrate)] と決定した。

b) ホルボールエステル関連化合物の調製

Ba(OH)/MeOH Fr. 18~20 を加水分解した後 (Cairner, Mirvish, Wallcave, Nagel & Smith, 1981; Mishra, Estensen & Abdel-Monem, 1986)、文献のスペクトルデータ (Hecker, 1966; Tseng, Van Duuren & Solomon, 1977; 1977; Evan

s & Kingborn, 1973;Hecker, Bartsch, Gschwent, Harle, Krelbich, Kubinyi et al., 1967) を参考にし、ホルボール [Phorbol] (化合物 9)、4 α -ホルボール (又はイソホルボール) [4 α -Phorbol, isophorbol] (化合物 19) 及び 4-デオキシ-4 α -ホルボール [4-deoxy-4 α -phorbol] (化合物 20) を得た。化合物 9 からホルボールの誘導体 (化合物 11) と化合物 12、そして化合物 11 から化合物 15 ~ 17 (Bartsch, Snatzke & Hecker, 1968;Hecker, Szczepanski, Kubinyi, Bresch, Harle, Schairer et al., 1966;Hecker, Kubinyi, Szczepanski, Harle & Bresch, 1965;Crombie, Games & Pointer, 1968;Zayed, Sorg & Hecker, 1984)、化合物 19 から化合物 21 ~ 23 (Hecker, Harle, Schairer, Jaboci, Hoppe, Gassmann et al., 1968) を合成した。室温、ピリジン中でメシルクロライドと化合物 1 の反応を行い、化合物 18 を得た。そして 254 nm の紫外線を照射することにより化合物 21 から化合物 24 を得た (Hecher et al., 1968)。

c) 化合物 1 ~ 24 による MT-4 細胞での HIV-1 誘発細胞病原性効果 (CPE) の阻害

HIV-1 急性感染による MT-4 細胞に出現する CPE の阻害に関し、種々のホルボールエステル及び関連化合物を検討した結果を下記表 3 に示す。

表 3 : 種々のホルボール誘導体の HIV-1 誘発 CPE の阻害及び PKC の活性化

| No | 抗 HIV-1 ($\mu\text{g/mL}$) | | | 各濃度における PKC の活性% | |
|----|------------------------------|-----------------|------|------------------|----------------------|
| | IC ₁₀₀ | CC ₀ | r* | 10ng/mL | 2.7 $\mu\text{g/mL}$ |
| 1 | 15.6 | 62.5 | 4.01 | 0 | 32 |
| 2 | 7.81 | 62.5 | 8.00 | 14 | 32 |
| 3 | 125 | 500 | 4.00 | 16 | 30 |
| | | | | | |

| | | | | | |
|----|---------|-------|-------|-----|-----|
| 4 | 7.81 | 31.3 | 4.01 | 0 | 0 |
| 5 | 31.3 | 62.5 | 2.00 | 10 | 40 |
| 6 | 0.0076 | 62.5 | 8220 | 0** | 17 |
| 7 | 15.6 | 62.5 | 4.01 | 16 | 30 |
| 8 | 0.00048 | 31.3 | 65200 | 96 | 98 |
| 9 | NE | 1000 | - | 8 | 39 |
| 10 | 125 | >1000 | >8.00 | 0 | 14 |
| 11 | 62.5 | 125 | 2.00 | 0 | 15 |
| 12 | NE | 31.3 | - | NT | 100 |
| 13 | 7.81 | 62.5 | 8.00 | 0 | 44 |
| 14 | 15.6 | 62.5 | 4.01 | 0 | 30 |
| 15 | 500 | 1000 | 2.00 | 0 | 26 |
| 16 | 31.3 | 125 | 3.99 | 0 | 0 |
| 17 | 125 | 250 | 2.00 | 0 | 26 |
| 18 | 7.81 | 125 | 16.0 | 24 | 24 |

| | | | | | |
|----|-----|------|------|---|----|
| 19 | NE | 500 | - | 1 | 5 |
| 20 | NE | 500 | - | 0 | 25 |
| 21 | 250 | 500 | 2.00 | 0 | 39 |
| 22 | NE | 62.5 | - | 0 | 0 |
| 23 | NE | NT | - | 0 | 60 |
| 24 | NE | 500 | - | 0 | 93 |

*: $r = CC_0 / IC_{100}$

** : 100 ng/mLにおいて、PKCの活性化は観察されなかった。

NE : 効果なし

NT : 試験せず

最も強い活性を示した化合物8と6の100%阻害濃度 (IC_{100}) はそれぞれ0.48と7.6 ng/mL、最小細胞毒性濃度 (CC_0) は31.3と62.5 μ g/mLであった。次に強い化合物は2, 4, 13, 18であった (IC_{100} : 7.8 μ g/mL ; CC_0 : 62.5, 31.3, 125 μ g/mL)。次いで化合物1, 7及び14は共に IC_{100} : 15.6 μ g/mLであった。化合物5と16は31.1 μ g/mLの濃度でHIV-1誘発細胞病原性を完全に阻害した。化合物3, 10, 11, 17は625-125 μ g/mLの濃度で効果を示した。化合物9, 12, 19, 20, 22, 24は500 μ g/mL以下の濃度では抗HIV-1活性が見られなかった。

d) 化合物1～24によるPKCの活性化

マウスの脳由来のPKCがカルシウム、ホスファチジルセリン及びTPAにより活性化される条件下で、化合物1～24の効果を10 ng/mLの標準濃度と

2. 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の高濃度で検討した (表 3 参照)。TPA (化合物 8) は何れの濃度においてもほぼ 100% の PKC 活性化作用を示した。ルミホルボール-12, 13, 20-トリアセテート [Lumiphorbol-12, 13, 20-triacetate] (化合物 24) は標準濃度では効果を示さなかったが、高濃度では 9.3% の PKC 活性化を示した。化合物 4, 16, 22 は 10 ng/mL ~ 2. 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲では活性化を示さなかった。強い抗 HIV 活性を有する化合物 6 は 10 ~ 100 ng/mL の濃度では活性化を示さなかったが、高濃度では 17% の PKC 活性化を示した。他の化合物、例えば化合物 1, 10, 11, 13 ~ 15, 17, 19 ~ 21 及び 23 は 10 ng/mL の濃度では PKC を活性化しなかったが、2. 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では 5 ~ 60% の活性化を示した。

e) 構造と活性の相関

構造と活性相関を調べる目的で、今回単離されたホルボールエステル類 (1 ~ 8) とその誘導体の抗 HIV-1 活性と PKC 活性化作用を検討した。全ての CPE 阻害活性ホルボール誘導体 (化合物 1 ~ 8, 13, 14, 16, 18) は A/B トランス配置であり、A/B シス配置の化合物 (化合物 19 ~ 24) には顕著な CPE 阻害作用が見られなかった。PKC 活性化は標準測定濃度 (10 ng/mL) では TPA を除き顕著な活性化は見られなかった。化合物 19 のエステル化体 (化合物 21, 23) や化合物 21 の分子内シクロ付加反応によって合成された化合物 24 は高濃度で PKC 活性を亢進させた。A/B 環の配置の他に、大部分の活性化合物は長鎖と短鎖のアシル基を有する 12, 13-或いは 13, 20-ジエステルであった (化合物 4, 8 の C-12 に、化合物 6 の C-13 及び化合物 1, 2 の C-20 に長鎖のアシル基を持つ)。この場合 12, 13-ジエステルの方が活性がより強かった。二つの短鎖を持つジエステル (化合物 3, 5) は CPE の弱い阻害作用を示すが、PKC の弱い活性化作用もあった。TPA (化合物 8, テトラデカノイル基とアセチル基を持つ) と化合物 6 (アセチル基とデカノイル基を持つ) は同じ様に強い CPE 阻害作用があるが、化合物 6 は 10 ~ 100 ng/mL の濃度範囲でも PKC を活性化しなかった。化合物 6 は IC_{100} の濃度 (7. 6 ng/mL) より 346 倍高濃度 (2. 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) においても 17% の活性化しか観察されなかった。化合物 4 (デカノイル基とメ

チル酪酸残基を持つ)は $7.81 \mu\text{g/mL}$ の濃度では完全にCPEを阻害し、その上PKC活性化作用も示さなかった。このことはアシル基の長さとその結合位置が両活性にとって重要であることを示唆している。

C-12に結合した長鎖のアシル基(例えば、テトラデカノイル基)は強いCPE阻害作用に不可欠な条件である。PKCの活性化にも同様な傾向があった(化合物8の様に)。C-12に結合した別の長鎖のアシル基(例えば、デカノイル基)(なお、デカノイル基以外に、化合物4ではC-13にメチル酪酸残基、化合物6ではアセチル基を有する)はCPE阻害に必要ではあるが、PKCの活性化には必要ないことが判った。化合物1の $\text{C}_{12}-\text{OH}$ をアセチル化するとPKC活性化作用を増強することなくCPE阻害作用を強める(化合物13の様に)。化合物1の α -(アセトキシシクロプロピル)カルビノール [α -(acetoxycyclopropyl)carbinol]のグループがホモアルリール転移した化合物18のCPE阻害活性が2倍に増強されることから、このグループの存在は阻害作用に必須なものではないと思われる。TPA(化合物8)のC-20にアセチル基を導入した化合物14では両活性は劇的に低下した。またTAの長鎖アシル基を除去すると、両活性が低下した。一方では、ホルボールアルコール(化合物9, 19, 20)はCPE阻害作用を示さず、弱いながらPKCを活性化した。ホルボールトリエステル(化合物11~16)の活性は多様であった。化合物9にアセチル基を付加すると化合物11の様にCPE阻害作用が増強した。化合物11の3位カルボニル基を還元した化合物15ではCPE阻害作用が消失することから、このカルボニル基が阻害作用と関係していることが示唆された。化合物11と比べ、 C_4-OH をメチル化した化合物16はPKCの活性化作用を示さず、CPE阻害作用は増強した。一方、化合物17に見られる様に C_4-OH と C_9-OH のアセチル化は特に重要な変化を与えなかった。化合物9のベンゾイル化は化合物12で示される様にPKCの活性化作用を増強させた。

ホルボールエステルとその関連化合物は種々の生化学的な作用を有することが報告され、構造-活性についての考察も多い(Evans et al., 1983; Evans et al., 1978; De Chaffoy de Courcelles et al., 1984; Hecker, 1978; Blumberg, 1980; Blumberg, 1981; Blumberg, 1988; Kupchan et al., 1976; Gustafson et al., 1992; Gschwe

ndt et al., 1974; Erickson, Beutler, Cardellina-11, McMahon, Newman & Boyd, 1995; Handa, Kinghom, Cordell & Farnsworth, 1983)。

今までのホルボールエステルの構造－活性相関について、CPE阻害とPKCの活性化の観点からまとめると、A/Bトランス配置と12, 13-或いは13, 20-ジアシル化は活性に必須である。これらは相当する多くのA/Bシス体で活性が著しく低下していることから示唆される。アシル基の長さとその結合位置は化合物の活性に種々な影響を与える。シクロプロピル-カルビノール(cyclopropyl-carbinol)グループは化合物の活性に必須ではない。化合物のCPE阻害作用はC-3のカボニル基の還元、エステル化、またアルカリ加水分解などにより著しく減少、或いは消失した。C₄-OHのメチル化はCPE阻害作用を増強し、PKC活性化作用の減少をもたらす様である。

f) 好ましい抗ウイルス剤の選択

種々のホルボール誘導体から好ましい抗ウイルス剤を選択するための評価基準として、本発明者らは、①MT-4細胞におけるHIV-1誘発細胞病原性効果(CPE)を100%阻害する濃度IC₁₀₀と、細胞増殖試験によりMT-4細胞の生存を減少させる濃度CC₅₀との比 $r = CC_{50} / IC_{100}$ が2以上であること、並びに②濃度10 ng/mLにおけるプロテインキナーゼC(PKC)の活性化が30%以下であることの二つを選択した。

表3に記載されたホルボール誘導体において、評価基準①により、No 9, 12, 19, 20, 22, 23, 24のホルボール誘導体が除かれる(何れも効果なし)が、他のホルボール誘導体のrは何れも2以上である。No 6, 8のホルボール誘導体は極めて大きなrの値を有するが、評価基準②により、強い発癌プロモーター作用を有するNo 8のホルボール誘導体は除かれる。

以上、総合的に判断すると、表3に記載されたホルボール誘導体のうちでは、No 6のホルボール誘導体が最も優れた抗ウイルス剤であることが判る。

なお、実用上の必要に応じて、更に種々の評価基準を取り入れて、最適な抗ウイルス剤を選択することが好ましい。

B. 本発明の抗ウイルス配合剤の成分(ii)について

本発明の抗ウイルス配合剤の成分(ii)は、ウイルスの複製過程又は成熟過程を

抑制又は阻害する薬剤として市販されているものをそのまま使用することができる。好ましいものは、前述の如く、以下の群：

- (1) ウイルスと細胞膜との結合を抑制する薬剤、
 - (2) ウイルスと細胞膜との融合を抑制する薬剤、
 - (3) 逆転写酵素阻害剤、
 - (4) インテグラーゼを介したDNAの組み込みを阻害する薬剤、
 - (5) プロウイルスの転写を抑制する薬剤、
 - (6) プロテアーゼを介したコアー蛋白質の合成を阻害する薬剤、
 - (7) コアー蛋白質の集合とパッケージングを抑制する薬剤、
 - (8) コアー蛋白質と殻外蛋白質の会合を抑制する薬剤、
 - (9) 細胞膜から遊離脱出した感染性のウイルス粒子の成熟を抑制する薬剤、及び
 - (10) 結合から成熟までの過程でウイルスの成熟に関わる因子を抑制する薬剤、
- から選択された薬剤である。

特に、抗HIV薬の場合には、成分(ii)は、例えば、(3)の逆転写酵素阻害剤：例えば、ジドブジン(AZT)、ジダノシン(ddI)、ザルシタビン(ddC)、ラミブジン(3TC)、サニルブジン(d4T)、アバカビル(ABC)、ジドブジン・ラミブジン製剤(AZT・3TC)、ネビラピン(NVP)、エファビレンツ(EFV)、N'-[1(S)-ベンジル-3-[4a(S), 8a(S), 3-(S)-第三ブチルカルバモイル]デカヒドロイソキノリン-2-イル]-2(R)-ヒドロキシルプロピル]-N''-(キノリン-2-イルカルバモイル)-L-アスパラギンアミド(Ro31-8959)又は(+)-S-4, 5, 6, 7-テトラヒドロ-5-メチル-6-(3-メチル-2-ブテニル)イミダゾ[4, 5, 1-jk][1, 4]ベンゾジアゼピン-2(1H)-チオン(R-82913, TIBO)、又はそれらの薬学上許容され得る誘導体、並びに、(6)のプロテアーゼを介したコアー蛋白質の合成を阻害する薬剤：例えば、インジナビル(IDV)、サキナビル(SQV)、リトナビル(RTV)、ネルフィナビル(NFV)又はアンブレナビル(APV)、又はそれらの薬学上許容され得る誘導体である。

本発明の抗ウイルス配合剤の用途に応じて、成分(ii)の薬剤を適宜選択する。成分(ii)の薬剤は1種類でもよいし、又は2種類以上を組み合わせ用いてもよ

い。

C. 本発明の抗ウイルス配合剤の製造について

前記成分(i)の薬剤と前記成分(ii)の薬剤と、必要であれば、更に他の添加剤とを好適な比率でブレンドして、本第一の発明の抗ウイルス配合剤及び本第二の発明の抗ウイルス配合剤を製造することができる。また本第一の発明の抗ウイルス配合剤及び／又は本第二の発明の抗ウイルス配合剤に、更に各種の解毒剤、式I又は式IIで表わされるホルボール誘導体以外の他の抗ウイルス剤、必要であれば、更に他の添加剤をブレンドして、本第三の発明の抗ウイルス配合剤を製造することができる。前記解毒剤、式I又は式IIで表わされるホルボール誘導体以外の他の抗ウイルス剤、及び他の添加剤は、市販されているものをそのまま使用してよい。前記成分(i)の薬剤、前記成分(ii)の薬剤、各種の解毒剤、式I又は式IIで表わされるホルボール誘導体以外の他の抗ウイルス剤、所望により添加する他の添加剤のブレンド比や本発明の抗ウイルス配合剤の形態は、用途や使用状況に応じて適宜選択してよい。

D. 本発明の抗ウイルス配合剤の作用機序について

1. ホルボール誘導体〔成分(i)〕の作用機序の確認

MOLT-4細胞とHIV-1持続感染細胞であるMOLT-4/HIV-1細胞とを含む溶液に、試料として種々のホルボール誘導体を添加して混合培養を行うことにより、細胞融合に関する種々のホルボール誘導体の抑制又は阻害効果(HIV-1誘発CPEの阻害及びPKCの活性化)について検討した。実験は、前述のAのh)～k)に準じて行った。結果を下記表4に示す。

表4：種々のホルボール誘導体のHIV-1による細胞融合の抑制又は阻害効果

| 化合物 No | 試料量 mg | 阻害活性 IC ₁₀₀ * ¹ | 細胞毒性 CC ₀ * ¹ | r = CC ₀ / IC ₁₀₀ | 毒性* ² 10ng/mL * ³ |
|-----------|-----------|--|--|--|--|
| 4 | 10 | 7.81 | 31.3 | 4 | 0 |
| | | | | | |

| | | | | | |
|-----------------|----|---------|------|--------|----|
| 5 | 6 | 31.3 | 62.5 | 2 | 10 |
| 6 | 10 | 0.0076 | 62.5 | >8200 | 0 |
| 8 ^{*4} | 15 | 0.00048 | 31.3 | >65000 | 96 |

*¹ : $\mu\text{g}/\text{mL}$

*² : プロテインキナーゼCの活性%

*³ : 試験時の化合物濃度

*⁴ : 対照化合物 (TPA)

表4から明らかな如く、化合物No6では0.0076 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも有意の細胞融合の抑制効果が認められた。本発明の抗ウイルス配合剤におけるホルボール誘導体は極めて低い濃度においても有意の抑制効果を有し、HIVウイルスの複製過程又は成熟過程の機序を示す図2における初期の段階、例えば、過程①や過程②に関与していることが考えられる。

なお、化合物No8 (TPA)では0.00048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも有意の抑制効果が認められたが、この化合物は毒性が強く、本発明の抗ウイルス配合剤における成分(i)として使用することはできない。

産業上の利用可能性

本発明の抗ウイルス配合剤では、成分(i)として用いる特定のホルボール誘導体と抗ウイルス性発現における作用機序が異なる薬剤を成分(ii)として用いることができる。それ故、好適に選択された成分(i)と成分(ii)とを主な有効成分とする本発明の抗ウイルス配合剤を用いれば、成分(i)による抗ウイルス性と、成分(ii)による抗ウイルス性が同時に発現し、すなわち異なる作用機序による複数の抗ウイルス性が同時に発現し得るため、非常に強力な抗ウイルス効果を得ることができる。

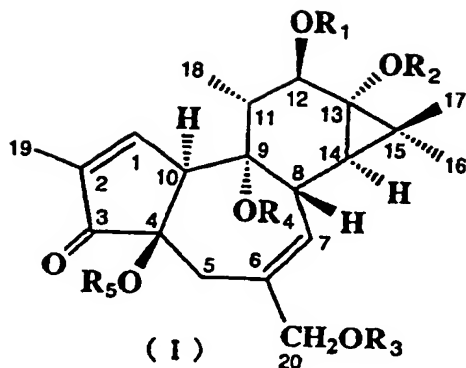
また、本発明の抗ウイルス配合剤は、変異の少ない細胞側を標的にしていることや抗ウイルス性発現において複数の作用機序を有し得るためウイルスの薬剤耐性が出現しにくく、HIV-1ウイルスに代表される薬剤耐性が出現し易いウイ

ルスに対して高い活性を示す。更に、本発明の抗ウイルス配合剤は、各種の解毒剤や式 I 又は式 II で表わされるホルボール誘導体以外の他の抗ウイルス剤を含み得るため、有害な副作用がなく、且つ多くのウイルスに対して有効である。

それ故、本発明の抗ウイルス配合剤は、特に抗 H I V 薬として有用である。

請求 の 範 囲

1. (i) 次式 I :

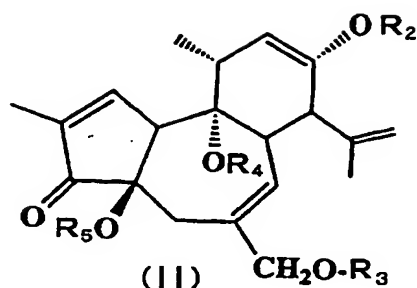


〔式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、互いに独立して、水素原子、脂肪族カルボン酸残基又は芳香族カルボン酸残基を表わす〕で表わされ、

MT-4 細胞における HIV-1 による細胞病原性効果 (CPE) を 100% 阻害する濃度 IC_{100} と、細胞増殖試験により MT-4 細胞の生存を減少させる濃度 CC_0 との比 $r = CC_0 / IC_{100}$ が 2 以上であり、且つ濃度 10 ng/mL におけるプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化が 30% 以下であるホルボール誘導体と、

(ii) ウイルスの複製過程又は成熟過程を抑制又は阻害する薬剤、
とを有効成分として含むことを特徴とする抗ウイルス配合剤。

2. (i) 次式II:



〔式中、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、互いに独立して、水素原子、脂肪族カルボン酸残基又は芳香族カルボン酸残基を表わす〕で表わされ、

MT-4 細胞における HIV-1 による細胞病原性効果 (CPE) を 100% 阻害する濃度 IC_{100} と、細胞増殖試験により MT-4 細胞の生存を減少させる濃度 CC_{50} との比 $r = CC_{50} / IC_{100}$ が 2 以上であり、且つ濃度 10 ng/mL におけるプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化が 30% 以下であるホルボール誘導体と、

(ii) ウイルスの複製過程又は成熟過程を抑制又は阻害する薬剤、

とを有効成分として含むことを特徴とする抗ウイルス配合剤。

3. 前記式 I で表わされるホルボール誘導体が式 I 〔式中、 R_1 、 R_4 及び R_5 は水素原子を表わし、 R_2 はアセチル基を表わし、 R_3 はリノール酸残基を表わし；又は R_1 、 R_4 及び R_5 は水素原子を表わし、 R_2 はチグロイル基を表わし、 R_3 はリノール酸残基を表わし；又は R_1 はアセチル基を表わし、 R_2 はチグロイル基を表わし、 R_3 、 R_4 及び R_5 は水素原子を表わし；又は R_1 はデカノイル基を表わし、 R_2 は 2-メチル酪酸残基を表わし、 R_3 、 R_4 及び R_5 は水素原子を表わし；又は R_1 はチグロイル基を表わし、 R_2 は 2-メチル酪酸残基を表わし、 R_3 、 R_4 及び R_5 は水素原子を表わす〕で表わされるホルボール誘導体であることを特徴とする請求項 1 記載の抗ウイルス配合剤。

4. ウイルスの複製過程又は成熟過程を抑制又は阻害する薬剤が、以下の群：

(1) ウイルスと細胞膜との結合を抑制する薬剤、
 (2) ウイルスと細胞膜との融合を抑制する薬剤、
 (3) 逆転写酵素阻害剤、
 (4) インテグラーゼを介したDNAの組み込みを阻害する薬剤、
 (5) プロウイルスの転写を抑制する薬剤、
 (6) プロテアーゼを介したコアー蛋白質の合成を阻害する薬剤、
 (7) コアー蛋白質の集合とパッケージングを抑制する薬剤、
 (8) コアー蛋白質と殻外蛋白質の会合を抑制する薬剤、
 (9) 細胞膜から遊離脱出した感染性のウイルス粒子の成熟を抑制する薬剤、及び
 (10) 結合から成熟までの過程でウイルスの成熟に関わる因子を抑制する薬剤、
 から選択された少なくとも1種の薬剤であることを特徴とする請求項1又は2記載の抗ウイルス配合剤。

5. 逆転写酵素阻害剤が、ジドブジン(AZT)、ジダノシン(ddI)、ザルシタビン(ddC)、ラミブジン(3TC)、サニルブジン(d4T)、アバカビル(ABC)、ジドブジン・ラミブジン製剤(AZT・3TC)、ネビラピン(NVP)、エファビレンツ(EFV)、N' - [1 (S) - ベンジル - 3 - [4 a (S), 8 a (S), 3 (S) - 第三ブチルカルバモイル) デカヒドロイソキノリン - 2 - イル] - 2 (R) - ヒドロキシプロピル -] - N'' - (キノリン - 2 - イルカルバモイル) - L - アスバラギンアミド(Ro31-8959) 又は (+) - S - 4, 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 5 - メチル - 6 - (3 - メチル - 2 - ブテニル) イミダゾ [4, 5, 1 - j k] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 2 (1H) - チオン(R-82913, TIBO)、又はそれらの薬学上許容され得る誘導体であることを特徴とする請求項4記載の抗ウイルス配合剤。

6. プロテアーゼを介したコアー蛋白質の合成を阻害する薬剤が、インジナビル(IDV)、サキナビル(SQV)、リトナビル(RTV)、ネルフィナビル(NFV) 又はアンブレナビル(APV)、又はそれらの薬学上許容され得る誘導体であることを特徴とする請求項4記載の抗ウイルス配合剤。

7. A) 以下の群:

(iii) 請求項1記載の抗ウイルス配合剤、及び

(iv)請求項 2 記載の抗ウイルス配合剤、
から選択された少なくとも 1 種の抗ウイルス配合剤、
並びに

B) 以下の群：

(v) ウイルスの増殖過程又は成熟過程の何れかを抑制又は阻害する薬剤に対する
解毒剤、及び

(vi)請求項 1 記載の式 I 又は請求項 2 記載の式 II で表わされるホルボール誘導体
以外の他の抗ウイルス剤、

(vii) 抗ウイルス剤に対する解毒剤、
から選択された少なくとも 1 種の薬剤
を含むことを特徴とする抗ウイルス配合剤。

図 1

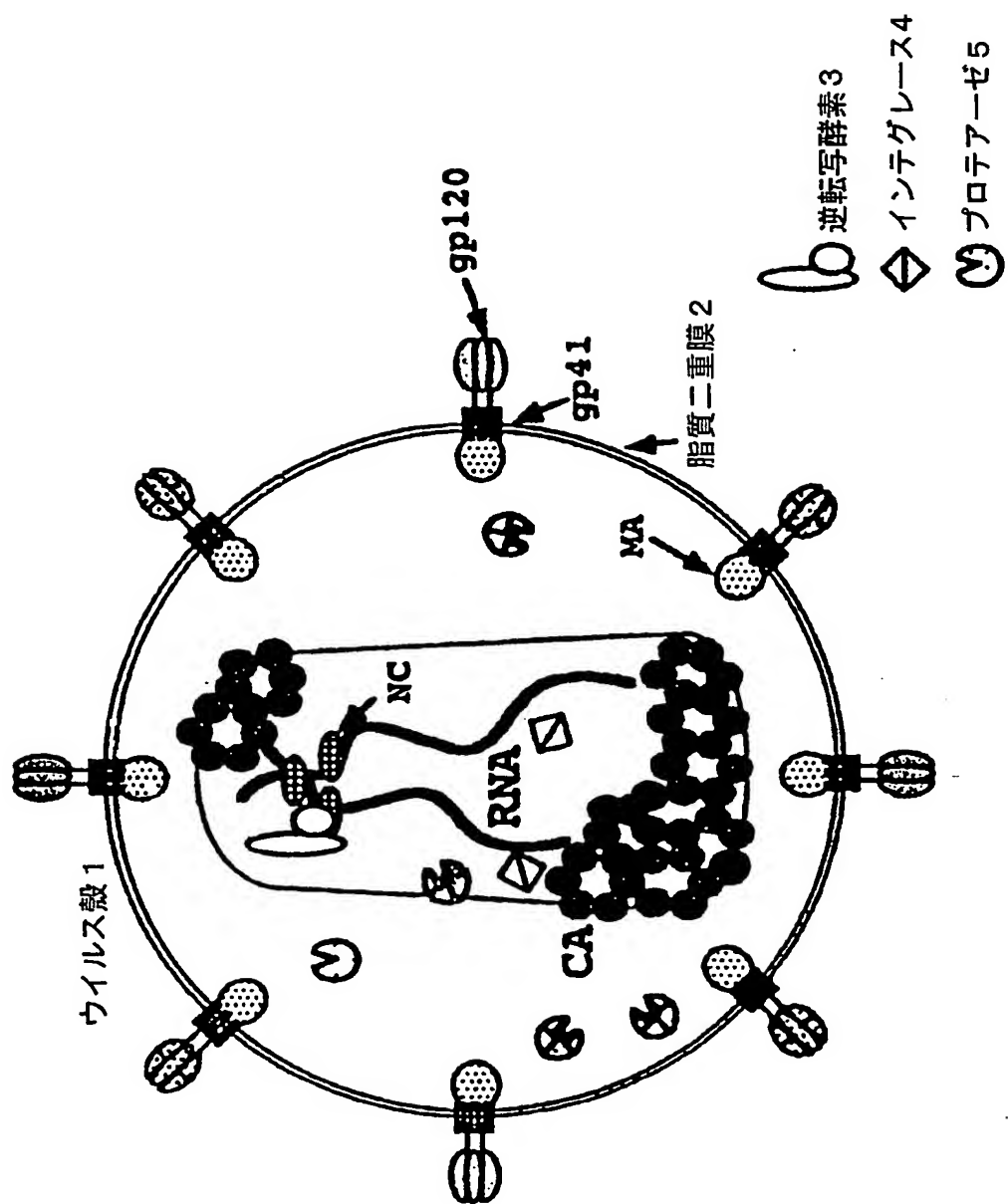
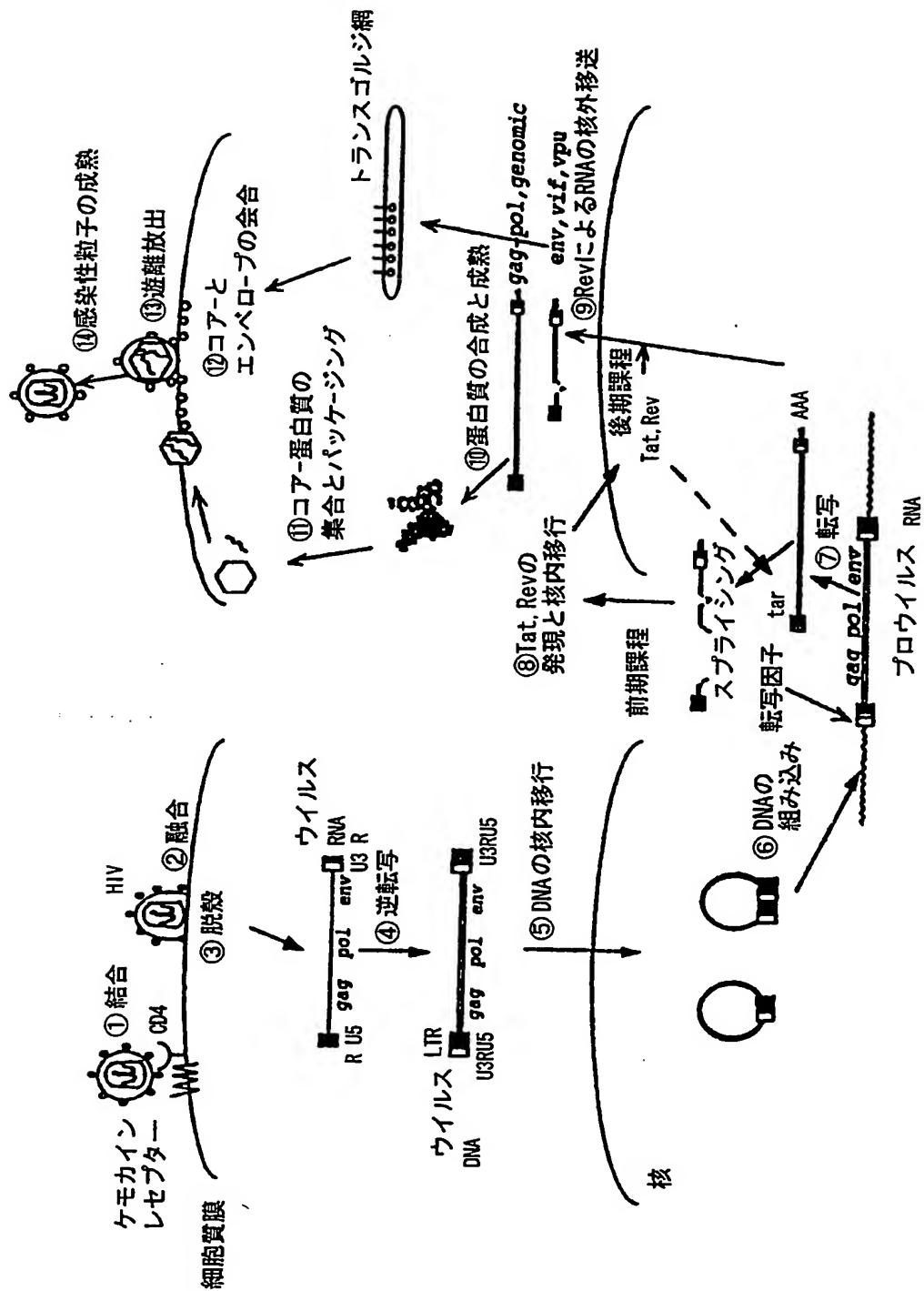


図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02913

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/22, A61K31/23, A61K31/231, A61K45/00, A61K31/122, A61K31/216,
A61P31/18// C07C69/22, C07C69/533, C07C69/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K, A61P31, C07C69

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | Sahar El-MEKKAWY, et al., "Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of <i>Croton tiglium</i> ", <i>Phytochemistry</i> , Vol.53, No.4, (09 February, 2000), pp.457-464, | 1-7 |
| X | Sahar El-MEKKAWY, et al., "12-O-acetylphorbol-13-decanoate potently inhibits cytopathic effects of human immuno-deficiency virus type 1 (HIV-1), without activation of protein kinase C", <i>Chem. Pharm. Bull.</i> , Vol.47, No.9, (1999), pp.1346-1347, | 1-7 |
| X | JP 10-287617 A (Tsumura & Co.), 27 October, 1998 (27.10.98), abstract; compounds in formula 1; Claims 1,7-9, (Family: none) | 1-7 |
| Y | M. H. BEERS, R. BERKOW ed., "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" (17th edition), (1999), Merck Research Laboratories (N.J.), pp.1321-1323 | 1-7 |
| Y | WO 98/04290 A2 (PERRINE, Susan, P.), 05 February, 1998 (05.02.98), | 1-7 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 June, 2000 (29.06.00)

Date of mailing of the international search report
11 July, 2000 (11.07.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02913

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| | abstract; page 32, line 3 to page 34, line 16; page 42, line 9 to page 44, line 25 & US, 5939456, A & EP, 969869, A2 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02913

Continuation of Box No.I-2 of Continuation of first sheet (1)

Phorbol derivatives (i), i.e., the active ingredient in the antiviral compositions as described in claims 1, 2 and 4 to 7 should satisfy the evaluation standards: ① having $r=CC_0/IC_{100}$ of 2 or more; and ② showing activation of PKC at 10 ng/mL of 30% or less; even in case of compounds involved in the scope of the formula I or II.

However, there are known more than 1,000 compounds involved in the scope of the above formula I or II and a number of compounds among them are known as having antiviral activity. Unless each compound is tested in practice, it cannot be understood whether each of these compounds satisfies the above evaluation standards or not.

Among the compounds 1 to 18 cited in the description which are involved in the scope of the above formula I or II, it is stated that compounds 8, 9 and 12 fail to satisfy the above evaluation standards. Since no special correlation is found out or predicted between the structures of these compounds and the above evaluation standards, the scope of the phorbol derivatives (i) described in the above claims cannot be clearly understood.

Such being the case, meaningful International Search cannot be practiced on claims 1, 2 and 4 to 7 in the present application.

Although complete International Search is impossible on the above claims, the International Search has been practiced on compounds (compounds 1 to 5) as described in claim 3 and compounds 6, 7, 10, 11 and 13 to 18 as cited in the description, concerning the phorbol derivatives (i).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02913

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1,2,4-7
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See extra sheet

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/02913

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/22, A61K31/23, A61K31/231, A61K45/00, A61K31/122, A61K31/216, A61P31/18
// C07C69/22, C07C69/53, C07C69/58

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K, A61P31, C07C69

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), REGISTRY(STN), MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X | Sahar El-MEKKAWY, et al., "Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of <i>Croton tiglium</i> ", Phytochemistry, Vol. 53, No. 4, (2000-Feb-9), p. 457-464, | 1-7 |
| X | Sahar El-MEKKAWY, et al., "12-O-acetylphorbol-13-decanoate potentially inhibits cytopathic effects of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), without activation of protein kinase C", Chem. Pharm. Bull., Vol. 47, No. 9, (1999), p. 1346-1347, | 1-7 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.06.00

国際調査報告の発送日

11.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

井上 典之

4C

9360

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | JP, 10-287617, A (Tsumura & Co.) 27.10月.1998 (27.10.98), 要約, 式1の化合物, クレーム1, 7-9, (ファミリーなし) | 1-7 |
| Y | M. H. BEERS, R. BERKOW 編, "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" (17th edition), (1999), Merck Research Labo- ratories (N. J.), p. 1321-1323 | 1-7 |
| Y | WO, 98/04290, A2 (PERRINE, Susan, P.) 5.2月.1998 (05.02.98), 要約, 第32頁第3行-第34頁第16行, 第42 頁第9行-第44頁第25行, & US, 5939456, A, & EP, 969869, A2 | 1-7 |

第 I 欄 2. の続き

請求の範囲 1, 2, 4-7 に記載の抗ウイルス配合剤の有効成分であるホルボール誘導体 (i) は、式 I 又は II に包含される化合物であっても、①「 $r = \text{CC}_0 / \text{IC}_{50}$ 」が 2 以上」であり、且つ②「 10 ng/mL における PKC の活性化が 30% 以下」であるという評価基準を満たすものでなければならないとされている。

しかしながら、上記式 I 又は II に包含される化合物は 1000 以上知られており、これらの化合物の中で抗ウイルス活性を有するものも多数知られている。そして、これら公知化合物が上記評価基準を満たすか否かは、個々の化合物全てについて実際に試験を行って見なければ理解することができないものである。

また、この出願の明細書に記載されている上記式 I 又は II に包含される化合物である化合物 1~18 のうち、化合物 8, 9, 12 は上記評価基準を満たさないとされており、これらの化合物の構造と上記評価基準の充足との間には特に相関関係は見いだせず、その予測性もないため、上記各請求の範囲に記載のホルボール誘導体 (i) の範囲を明確に把握することができない。

したがって、この出願の請求の範囲 1, 2, 4-7 は、有意義な国際調査をすることができる程度に明確に記載されていない。

なお、上記各請求の範囲については、完全な国際調査を行うことはできなかったが、ホルボール誘導体 (i) について、請求の範囲 3 に記載の化合物 (化合物 1~5) に及び明細書に記載の化合物 6, 7, 10, 11, 13~18 に基づいて国際調査を行った。

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1, 2, 4-7 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

(特別ページを参照)
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。